

(19)

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication
number: 100250832 B1
(44)Date of publication of specification:
07.01.2000

(21)Application number: 1019970030697

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF
SCIENCE AND
TECHNOLOGY

(22)Date of filing: 02.07.1997

(72)Inventor: HONG, HYO JEONG
RYU, CHUN JE

(30)Priority: ..

(51)Int. Cl C12N 15/13

(54) CDNA CODING RATS MONOCLOINAL ANTIBODY RECOGNIZING ANTIGEN PRE-S1 EPITOPE OF
HEPATITIS B VIRUS

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is cDNA gene coding rats monoclonal antibody KR359 which binds with 43~49 amino acids of antigen pre-S1 epitope of hepatitis B virus in order to use the gene to bind with human antibody genes and consequently develop human antibodies with fewer side effects. CONSTITUTION: cDNA gene coding rats monoclonal antibody KR359 is obtained by the following steps of: i) extracting RNA from hybridoma cell line (KCTC 0334 BP) and synthesizing cDNA for light and heavy chains; ii) implementing PCR with cDNA as a template and a primer of sequence ID. No. 1 of 5-GCAGTCGACT GAGGCACCTC CAGATGTTAA C-3 for light chain and a primer of sequence ID. No. 2 of 5-CGGTCGACAG GGATCCAGAG TTCCAGGTCA C-3 for heavy chain; iii) and obtaining 420bp cDNA of sequence ID. No. 8 described as in the description as a light chain and 500bp cDNA of sequence ID. No. 9 described as in the description as a heavy chain. Wherein, cDNA is also used in constructing plasmid vectors pKR127H and pKR127K.

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19970702)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (19991011)

Patent registration number (1002508320000)

Date of registration (20000107)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
Number of trial against decision to refuse ()
Date of requesting trial against decision to refuse ()
Date of extinction of right ()

1/1

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/13(11) 공개번호 특 1999-008650
(43) 공개일자 1999년02월05일

(21) 출원번호 특 1997-030697
 (22) 출원일자 1997/07/02일

(71) 출원인 한국과학기술연구원 박원준
 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1번지
 흥호정

(72) 발명자 대전광역시 유성구 가정동 237 케이아이티아파트 15동 401호
 류춘재
 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 136동 1203호

(74) 대리인 이원희

실사항구 : 영역

(54) 비형 간염 바이러스의 표면 항원 프리-S1 에피토프를 인식하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 이를 암호화하는 유전자 및 그의 염기 서열

요약

본 발명은 B형 간염 바이러스 (HBV)의 표면 항원 프리-S1 에피토프에 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 그의 cDNA 유전자 및 그의 염기 서열에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 HBV 의 표면항원 프리-S1 의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 이를 암호화하는 중쇄와 경쇄 cDNA 유전자, 그들의 염기 서열 및 이를 포함하는 플라스미드 벡터들에 관한 것으로서, 상기 유전자는 HBV 감염을 예방하고 치료하는 인간화 항체 등을 개발하는데 사용될 수 있다.

대표도도 1영세서도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 생쥐 단일클론항체 KR127 의 가변 영역을 암호하는 경쇄 유전자의 cDNA 염기 서열 및 이로부터 유추한 아미노산 서열이고,

도 2는 본 발명의 생쥐 단일클론항체 KR127 의 가변 영역을 암호하는 중쇄 유전자의 cDNA 염기 서열 및 이로부터 유추한 아미노산 서열이다.

발명의 상세한 설명발명의 목적발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus, 이하 HBV 라고 약칭함)의 표면 항원 프리-S1 에피토프에 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, cDNA 유전자 및 그의 염기 서열에 관한 것이다.

보다 상세하게는, 본 발명은 HBV 의 표면항원 프리-S1 의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 이를 암호하는 중쇄와 경쇄 cDNA 유전자, 그들의 염기 서열 및 이를 포함하는 플라스미드 벡터들에 관한 것으로서, 상기 유전자는 HBV 감염을 예방하고 치료하는 인간화 항체 등을 개발하는데 사용될 수 있다.

B형 간염 바이러스 (HBV)는 사람에 침입하여 만성 및 급성 간염을 일으키고, 암화될 경우 간경화와 간암의 원인이 되는 병원체로서, 전세계적으로 3억명에 이르는 사람이 감염된 것으로 추산된다 (Tziolais Buendia, Sci. Am., 264: 48, 1991).

HBV 에 감염된 경우, 특히 HBV 양성이 모친으로부터 태어나는 신생아, HBV 에 노출된 의료기관 종사자 또는 HBV 관련 간질환으로 인해 간이식 수술을 받은 환자에서 HBV 감염을 방지하기 위해 HB 면역 글로불린 (HB immunoglobulin, HBIG)이 사용되고 있다 (Beasley, et al., Lancet, 2: 1099, 1983; Todo, et al., Hepatol., 13: 619, 1991). 그러나 현재 사용되는 HBIG 는 혈장으로부터 추출되기 때문에 특이도 (specificity)가 낮고 오염원에 노출되어 있으며, 이를 대량 생산하는데 사람 혈액의 계속적인 공급이 필요

요하다는 단점이 있다. 이러한 단점은 HBV의 표면항원에 대한 단일글로형체를 개발하여 사용하면 극복할 수 있다.

HBV의 피막은 3개의 단백질로 구성되는데, 구체적으로 S 항원을 포함하는 주(major) 단백질, S 항원과 프리-S2 항원을 포함하는 중(middle) 단백질 및 S 항원, 프리-S2 항원과 프리-S1 항원을 포함하는 대(large) 단백질로 구성된다(Neurath, A.R. and Kent, S.B.H., Adv. Vir. Res. 34: 65-142, 1988). 이 모든 표면항원 단백질들은 HBV를 중화시키고 무력화하는 환경에 유도하며, 특히 프리-S-부위에 의해 유도되는 환경은 바이러스의 제거 및 HBV 감염에 대한 회피과 관련이 있고 S항원에 대한 무면역반응(Non-responsiveness)을 극복할 수 있다(Iwarson, S. et al., J. Med. Virol. 16: 89-96, 1985; Itch, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9174-9178, 1986; Neurath, A. R. et al., Vaccine, 7: 234-236, 1989; Budkowska, A. et al., J. Med. Virol., 20: 111-125, 1986; Millich, D. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8168-8172, 1985; Neurath, A. R. et al., J. Med. Virol., 17: 119-125, 1986; Millich, D. R. et al., J. Immunol., 137: 315-322, 1986). 특히 프리-S1 단백질의 21-47번 아미노산 부위는 사람 간세포의 HBV 수용체와 결합하여 바이러스가 간세포에 감염하는데 결정적인 역할하므로, 이 부위에 특이한 단일글로형체는 바이러스 중화에 매우 중요한 역할을 할 수 있다(Neurath, et al., Vaccine, 46: 429, 1986; Pontisso, et al., Virol., 173: 533, 1988; Neurath, et al., Vaccine, 7: 234, 1989).

본 발명자 등은 HBV의 표면항원 프리-S1 단백질의 21-47번 아미노산 부위에 대한 단일글로형체를 얻기 위하여 시도한 결과, 이를 에피토프를 특이적으로 인식하는 다양한 단일글로형체를 개발하였다. 특히 43-49번 아미노산 위치의 에피토프를 인식하는 단일글로형체 KR127는 adr, adw, ayw 등 여러 타입의 HBV에도 광범위하게 적용성이 확인되어, HBV 감염을 예방하고 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

그러나 상기 성격에서 만들어진 단일글로형체는 사람에게 주사하였을 경우 면역반응을 유발하는 부작용을 나타낸다. 따라서, 상기 환경을 인간화시킨 인간화항체를 사용하여 이러한 문제점을 줄이려는 시도가 이루어졌다. 인간화 환경은 상기 단일글로형체의 가변 영역 중에서 항원과 직접 결합하는 CDRs(complementarity determining regions) 영역을 사람 항체에 이식시켜 제조할 수 있다. 이를 위해서 생쥐 항체 가변 영역의 유전자를 갖고 이를 유전자 조제한 방법으로 사람 항체의 유전자와 융합시켜 동물세포에서 발현시켜야 한다(Verhoeven, et al., Science, 239: 1534-1536, 1988).

이에 본 발명자들은 HBV 감염을 효과적으로 예방하고 치료하는 인간화 단일글로형체를 제조하기 위하여, HBV 표면 항원 프리-S1의 43-49번 아미노산 위치의 에피토프와 결합하는 단일글로형체 KR127를 생산하는 하이브리도마 세포주를 이용하여 상기 항체 가변 영역의 중쇄와 경쇄 cDNA를 얻고 그의 DNA 염기 서열을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 이론고지 하는 기술적 과정

본 발명은 HBV의 표면항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일글로형체 KR127의 가변 영역, 이를 암호하는 중쇄와 경쇄 cDNA 유전자 및 그 염기 서열을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 생쥐 단일글로형체 KR127의 가변 영역을 암호하는 중쇄 cDNA 유전자 및 그의 서열 9의 염기 서열을 제공한다. 또한 본 발명은 생쥐 단일글로형체 KR127의 가변 영역을 암호하는 경쇄 cDNA 유전자 및 그의 서열 8의 염기 서열을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 단일글로형체의 중쇄 유전자를 포함하는 폴리아미드 벡터 pKR127H (수탁번호 : KCTC 0333 BP) 및 경쇄 유전자를 포함하는 폴리아미드 벡터 pKR127K (수탁번호 : KCTC 0334 BP)를 제공한다.

또한, 본 발명은 서열 11의 중쇄 및 서열 10의 경쇄로 이루어진 생쥐 단일글로형체 KR127의 가변 영역을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 HBV의 표면항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프와 결합하는 생쥐 단일글로형체 KR127를 생산하는 하이브리도마 세포주(수탁번호 : KCTC 0299 BP)를 이용한다.

구체적으로 상기 하이브리도마 세포주로부터 RNA를 추출하여 경쇄 및 중쇄 유전자의 cDNA를 합성하고, 이를 주형으로 하여 경쇄의 경우 서열 1의 시발체를 이용하고 중쇄의 경우 서열 2의 시발체를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 그 결과 본 발명의 서열 8의 염기 서열을 포함하는 약 420 bp 크기의 경쇄 cDNA 유전자 및 서열 9의 염기 서열을 포함하는 약 500 bp 크기의 중쇄 cDNA 유전자를 분리하였다.

상기 cDNA 유전자들을 폴리아미드 벡터 pBluescript KS+에 각각 클로닝하여 본 발명의 폴리아미드 벡터 pKR127H 및 pKR127K를 제조하였다.

상기 폴리아미드 벡터들을 대량균에 형질전환시켜 얻은 형질전환체를 1997년 5월 29일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0333 BP, KCTC 0334 BP).

또한, 본 발명은 서열 11의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역 및 서열 10의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역으로 이루어진 생쥐 단일글로형체의 가변 영역을 제공한다.

본 발명의 생쥐 항체 가변 영역의 유전자는 생쥐 항체를 인간화시키는데 이용될 수 있다. 생쥐 단일글로형체의 가변 영역 중에서 항원체와 직접 결합하는 CDRs 영역을 사람 항체에 이식시켜 인간화 항체를 제조하여 부작용이 없는 단일글로형체를 제조할 수 있고, 특히 단일글로형체 KR127를 이용한 인간화 항체는 adr, adw, ayw 등 여러 타입의 HBV를 예방하고 치료하는데 광범위하게 적용될 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명하기로 한다. 단 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 발명이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 생쥐 하이브리도마 KR127 세포주로부터 전체 RNA의 분리 및 그의

cDNA 합성

HB 표면 항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 인식하는 생쥐 단일클론항체를 생산하는 1×10^7 개의 하이브리도마 KR127 세포주로부터 단일 단계 방법 (Single step method; Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem., 162: 156-159, 1987)으로 추출한 전체 RNA 10 μ g을 주형으로 사용하고 경색의 경우는 서열 1의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (31-머)를, 중쇄의 경우는 서열 2의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (31-머)를 각각 50 pmol 씩 황제 불변영역에 상보적인 시발체로 사용하여 70°C에서 10분 동안 어울렸을 때졌다. 이에 수퍼스크립트 II (Superscript II, 기드코사) 헤스터 험가하여 역전사반응을 수행함으로써 1차 cDNA 를 합성하였다.

상기 단일클론항체의 유전자는 합성된 1차 cDNA 의 5분의 1분획을 주형으로 하고 벤트 DNA 중합효소 (Vent DNA polymerase, 뉴잉글랜드 바이오파사)를 사용한 PCR 을 수행하여 증폭시켰다. 이 때 사용한 시발체는 경색의 경우, 3'쪽 시발체는 면역유전자 카파사를 불변 영역에 상보적인 서열 1의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머, 5'쪽 시발체는 가변 영역의 다양한 아미노 말단을 고려하여 고안한 혼합된 시발체로서 3'쪽 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (33-머)와 5'쪽 시발체로는 면역유전자 Cγ1 염기의 상보적인 서열 2의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (33-머) 두 종류의 시발체를 사용하였다. 중쇄의 경우는 3'쪽 시발체로는 면역유전자 Cγ1 염기의 상보적인 서열 2의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (31-머)를, 5'쪽 시발체로는 가변 영역의 다양한 아미노 말단을 고려하여 고안한 혼합된 시발체로서 서열 5의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (46-머), 서열 6의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (32-머), 및 서열 7의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (32-머), 세 종류의 시발체를 사용하였다.

PCR 생산물의 흡출액은 풀로보를 위하여 경색의 경우는 3'쪽 시발체 말단에 *SacI* / 제한효소 자리를 부여하였고 중쇄의 경우에는 5'쪽 시발체와 3'쪽 시발체에 동시에 *SacI* / 제한효소 자리를 부여하였다. PCR 은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분, 반응조건으로 30회 반복하여 수행하였다. 그 결과 상기 시발체 위치로부터 추정되는 길이인 경색은 약 420bp, 중쇄는 약 500bp 크기에 해당되는 부위에서 증폭된 DNA 를 얻을 수 있었다.

실시예 2 생쥐 단일클론항체 KR127 유전자의 풀로보

상기 실시예 1에서 증폭한 경색 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 PCR 산물을 *T₄* 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 (polynucleotide kinase, 베링거 만하임사)로 인산화 반응을 시킨 다음 *SacI* / 으로 처리하고, 1% 아가로스 풀에 전기시커 약 500bp에 해당하는 DNA 를 진출인 II (GeneClean II, Bio101사)를 사용하여 분리하였다. 이를 풀로보하기 위하여 풀라스미드 벡터 pBluescript SK+는 *SacI* / 으로 처리하고 다시 *SacI* / 으로 처리한 다음 진출인 II (GeneClean II, Bio101사) 키트를 사용하여 분리하였다. 이 두 DNA 를 *T₄* DNA 라이케이즈 (뉴잉글랜드 바이오파사)를 사용하여 연결하고 대장균 NM522 에 *CaCl₂* 방법으로 형질전환한 다음, 약 420bp, 크기의 DNA 산출물을 가진 K1, K4, K6 풀론을 선별하였다.

또한, 중쇄 유전자를 풀로보하기 위해서 상기 실시예 1에서 증폭한 중쇄 유전자를 *SacI* / 으로 처리하고, 1% 아가로스 풀에 전기시커 약 500bp에 해당하는 DNA 를 진출인 II (GeneClean II, Bio101사)를 사용하여 분리하였다. 풀로보는 벡터로 사용할 풀라스미드 벡터 pBluescript KS+는 *SacI* / 으로 처리하고 송이지장 밀인산화효소 (Calf intestinal phosphatase, 뉴잉글랜드 바이오파사)로 밀인산화 반응을 시킨 다음, 진출인 II (GeneClean II, Bio101사)를 사용하여 분리하였다. 이 두 DNA 를 *T₄* DNA 라이케이즈 (뉴잉글랜드 바이오파사)를 사용하여 연결하고 대장균 NM522 에 *CaCl₂* 방법으로 형질전환한 다음, 500bp 크기의 DNA 산출물을 가진 H3, H5, H6, H8 풀론을 선별하였다.

상기 면역 유전자들의 DNA 염기 서열을 분석하기 위하여, 상기의 각 풀론들을 150 u.g/㎕의 암피실린이 함유된 1ml 의 2 x YT 배지에서 0~0.5 까지 키운 뒤 대장균수보다 10배 더 많은 페퍼 파자 M13K07 (helper phage M13K07) 를 넣어주고 7μg/ml의 카니마이신이 함유된 10ml의 2 x YT 배지에서 6시간 더 배양한 다음 실온에서 단선 DNA를 5% 풀리에칠릴카리아이콜 (PEG)로 농축하고 페퍼/글로우포屡으로 아리번 추출하여 분리하였다. 이 단선 DNA를 주형으로 T₃ 또는 T₇ 시발체를 사용하고 시크네이즈 버전 II 키트 (Sequenace version II kit, 애버산사)를 이용하여 각 풀론들의 염기 서열을 분석하였다. 그 결과 경색의 4 가지 풀론들의 염기 서열이 모두 같았으며, 이 풀론에서 분리한 풀라스미드 벡터를 pKR127K 라 명명하였다. 중쇄도 3 가지 풀론들의 염기 서열이 모두 같았으며, 이 풀론에서 분리한 풀라스미드 벡터를 pKR127H 라 명명하였다. 이상에서 확인된 염기 서열 결과는 1 및 2도 나타나 있다.

상기 풀라스미드 벡터를 1997년 5월 29일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다. (수탁번호 : KCTC 0333 BP, KCTC 0334 BP).

실시예 3 cDNA 의 염기 서열 분석

생쥐 단일클론항체 KR127 의 기본영역을 왕화하는 DNA 염기 서열을 분석한 결과, 이 면역유전자들은 항체 구조에 특징적인 전기와 배율을 응집하게 갖추고 있으며, 구조적으로 중쇄는 면역글로불린 어리 그룹 가운데서 생쥐 서브그룹 II(A)에 속하며, 경색은 생쥐 서브그룹 II-E에 속한다. 항원을 인식하는 CDR 장기로는 중쇄의 경우, CDR1 은 31-35, CDR2 는 50-66, CDR3 는 99-104 아미노, 경색의 경우 CDR1 은 24-39, CDR2 는 55-61, CDR3 는 94-102 아미노에 해당하였다. 구조상 필수적인 디설파드 결합은 중쇄의 경우 22번과 96번 시스테이인, 경색의 경우 23번과 93번 시스테이인에 관여하였다. 가변 영역의 말단 부분인 J (Joining) 미니유전자는 경색의 경우 103-115번에, 경색은 103-113번에 위치하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 본 발명의 풀라스미드 벡터 pKR127K 와 pKR127H 에 글로벌되어 있는 경색 및 중쇄 유전자는 가능성을 확인할 수 있었다.

발현의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, HBV 의 표면항원 프리-S1 의 43-49번 아미노산 위치에 결합하는 새로운 단일
oligonucleotide KR127 의 가변 영역의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA 유전자는 기능적이므로 이를 인간 항체 유
전자와 결합시켜 발현시키면 adr, adw, ayw 등 여러 타입의 HBV 중화에 부작용이 적은 인간화 항체를 개
발할 수 있고, 이는 HBV 감염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[서열 목록]

서열번호 : 1

서열의 길이 : 31

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (울리고 뉴클레오타이드)

서열 1

5'-GCAGTCGACT GAGGCACCTC CAGATGTTAA C-3'

[서열 목록]

서열번호 : 2

서열의 길이 : 31

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (울리고 뉴클레오타이드)

서열 2

5'-CGGTCGACAG GGATCCAGAG TTCCAGGTCA C-3'

[서열 목록]

서열번호 : 3

서열의 길이 : 33

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (울리고 뉴클레오타이드)

서열 3

5'-AGATTCTAGA (A/T)TG(A/C)TGACCC AA(A/T)CTCCACT CTC-3'

[서열 목록]

서열번호 : 4

서열의 길이 : 33

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

서열 4

5'-AGGTTCTAGA GT(G/T)CTCAC(C/T)C A(A/G)TCTCCAGC AAT-3'

[서열 목록]

서열번호 : 5

서열의 길이 : 46

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

서열 5

5'-ATATGTCGAC GAGGTGAAGC TGCAGGAGTC AGGACCTAGC CTGGTG-3'

[서열 목록]

서열번호 : 6

서열의 길이 : 32

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

서열 6

5'-ATATGTCGAC AGGT(C/G)(A/C)AACT GCAG(C/G)AGTC(A/T) GG-3'

[서열 목록]

서열번호 : 7

서열의 길이 : 32

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

서울 7

5'-ATATGTCGAC AGGT(C/G)CAGCT GCAG(C/G)AGTC(A/T) GG-3'

[서 일 목 룹]

서일번호 : 8
 서일의 길이 : 324
 서일의 형 : 핵산
 셰의 수 : 1본체
 형태 : 직쇄상
 서일의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

서일 8

GATATCITGA TGACCCAAAC TCCACTTATT TTGTCGGTTA CCATTGGACA ACCAGGCTCT	60
ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA TATAGTAATG GAAAAACCTA TTTGAATTGG	120
TTTATTACAGA GGCCAGGCCA GTCTCCAAAG CGCTTAATCT ATCTGGTGTCA TAAACTGGAC	180
TCTGGAGTCC CTGACAGGTTC CACTGGCACT GGATCAGGAA CAGATTTAC ACTGAAAATC	240
ATCAGAGTGG AGGCTGAGGA TTGGGGATT TATTACTCGG TGCAAGGTAC ACATTTCTCT	300
CAGACGTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAACGG	339

[서 일 목 룹]

서일번호 : 9
 서일의 길이 : 345
 서일의 형 : 핵산
 셰의 수 : 1본체
 형태 : 직쇄상
 서일의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

서울 9

CAGGTGCAGC TGCAGCAGTC TGGACCTGAA CTGGTGAAGC CTGGGGCCTC AGTGAAGATT 60
 TCTCGAAAG CTTCTGGCTA CGCATTCAGT AGTCTTGGA TGAACCTGGT GAAGCAGAGG 120
 CCTGGACAGG GTCTTGAGTG GATTGGACGG ATTATCCTG GAGATGGAGA TACTAACTAC 180
 AATGGGAAGT TCAAGGGCAA GGCCACACTG ACTGCAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAC 240
 ATGCAGCTCA GCAGGCTGAC CTCTGTGGAC TCTGGGTCT ATTTCCTGTC AAGAGAGTAC 300
 GACGAGGCCCTT ACTGGGGCCA AGGGACTCTG GTCACTGTCT CTGCA 345

[서울 목록]

서울번호 : 10
 서울의 길이 : 113
 서울의 형 : 아미노산
 쇄의 수 : 1분쇄
 형태 : 주체상
 서울의 종류 : 단백질

서울 10

D	I	L	M	T	Q	T	P	L	I	L	S	V	T	I	G	16
Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	Y	S	32
N	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G	Q	S	48
P	K	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	64
D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	80
I	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	V	Q	G	96
T	H	F	P	Q	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	112
R																113

[서울 목록]

서울번호 : 11
 서울의 길이 : 115
 서울의 형 : 아미노산
 쇄의 수 : 1분쇄

형태 : 적색상
서열의 종류 : 단백질

서열 11

Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	16
S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	A	F	S	S	S	32
W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	48
G	R	I	Y	P	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K	F	64
K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	80
M	Q	L	S	S	L	T	S	V	D	S	A	V	Y	F	C	96
A	R	E	Y	D	E	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	112
V	S	A														115

(57) 청구의 범위

청구항 1

B형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1 의 43~49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 중쇄의 가변 영역을 암호하는 서열 9의 염기 서열을 포함하는 cDNA 유전자.

청구항 2

B형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1 의 43~49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 경쇄의 가변 영역을 암호하는 서열 8의 염기 서열을 포함하는 cDNA 유전자.

청구항 3

제 1항의 cDNA 유전자가 포함하는 플라스미드 백터 pKR127H.

청구항 4

제 3항의 플라스미드 백터로 형질전환된 대장균 형질전환체 DH5 α /pKR127H (수탁번호 : KCTC 0333 BP).

청구항 5

제 2항의 cDNA 유전자를 포함하는 플라스미드 백터 pKR127K.

청구항 6

제 5항의 플라스미드 백터로 형질전환된 대장균 형질전환체 DH5 α /pKR127K (수탁번호 : KCTC 0334 BP).

청구항 7

B형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1 의 43~49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 서열 10의 경쇄 및 서열 11의 중쇄로 이루어진 생쥐 단일클론항체의 가변 영역.

청구항 8

제 1항 및 제 2항의 생쥐 단일클론항체의 가변 영역 유전자를 인간 항체 유전자와 융합시켜 HBV 표면 항원 프리-S1를 인식하는 인간화 항체를 생산하는데 사용하는 용도

도면

~~EBI~~

1	GAT ATC TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTT ATT TTG TCG GTT ACC	42
1	D I L M T Q T P L I L S V T	14
43	ATT GGA CAA CCA GCC TCT ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC	84
15	I G Q P A S I S C K S S Q S	28
85	CTC TTA TAT AGT AAT GGA AAA ACC TAT TTG AAT TGG TTA TTA	126
29	L L Y S N G K T Y L N W L L	42
127	CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG	168
43	Q R P G Q S P K R L I Y L V	56
169	TCT AAA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT	210
57	S K L D S G V P D R F T G S	70
211	GGA TCA GGA ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC ATC AGA GTG GAG	252
71	G S G T D F T L K I I R V E	84
253	GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC GTG CAA GGT ACA CAT	294
85	A E D L G V Y Y C V Q G T H	98
295	TTT CCT CAG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA	336
99	F P Q T F G G G T K L E I K	112
337	CGG	339
113	R	113

~~522~~

1	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CCT	42
1	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	14
43	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAA	GCT	TCT	GGC	TAC	GCA	84
15	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	A	28
85	TTC	AGT	AGT	TCT	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	126
29	F	S	S	S	W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	42
127	CAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGG	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA	168
43	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	Y	P	G	D	G	56
169	GAT	ACT	AAC	TAC	AAT	GGG	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	210
57	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G	K	A	T	L	70
211	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	252
71	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	84
253	AGC	CTG	ACC	TCT	GTG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	294
85	S	L	T	S	V	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	98
295	GAG	TAC	GAC	GAG	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	336
99	E	Y	D	E	A	Y,	W	G	Q	G	T	L	V	T	112
296	GTC	TCT	GCA												345
113	V	S	A												115